T-SPOT.TB

Aide au diagnostic de l'infection tuberculeuse

NOTICE

Pour usage diagnostique *in vitro*

Cette notice concerne l'utilisation du produit suivant :

T-SPOT.*TB 8* (Format Plaque à bandes de 8 puits à usage multiple. Numéro de catalogue : TB.300)

Oxford Immunotec

Harnessing the power of T cell measurement

Table des matières **Page**

Utilisation prévue	2
Introduction	2
Principes de la procédure	2
Limitations	3
Mises en garde sécuritaires et précautions	4
Matériel fourni	4
Conservation	4
Stabilité	5
Equipement et matériel nécessaires mais non fournis	5
Préparation du réactif	5
Méthode	6
Prélèvement et préparation des échantillons	6
Comptage des cellules et dilution	7
Préparation de la plaque et incubation	8
Développement et comptage des spots	9
Contrôle de la qualité	10
Interprétation des résultats et critères du test	10
Caractéristiques de performance du test	11
Références	12
Glossaire des symboles	12

Utilisation prévue
Le test T-SPOT®.*TB* est un outil de diagnostic *in vitro* de détection des cellules T effectrices qui répondent à une activation par les antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* ; il est destiné à être utilisé comme aide au diagnostic de l'infection tuberculeuse (TB). Le test T-SPOT.*TB* est une procédure immunoenzymatique (ELISPOT) simplifiée qui comptabilise les cellules T effectrices individuelles activées par des antigènes spécifiques de la tuberculose.

Introduction
L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'un tiers de la population mondiale est infecté par *M. tuberculosis*. Chaque personne porteuse d'une infection tuberculeuse latente (LTBI) présente un risque d'environ 10 % d'évolution vers la forme active. Ce taux de progression est élevé chez certains groupes, y compris ceux ayant été récemment infectés et ceux dont le système immunitaire est affaibli.

La réponse immunitaire à l'infection par *M. tuberculosis* est principalement une réponse immunitaire à médiation cellulaire (CMI). Dans le cadre de cette réponse, les cellules T sont sensibilisées aux antigènes de *M. tuberculosis*. Les cellules T effectrices activées, CD4 et CD8, spécifiquement séparées du sang, peuvent être quantifiées du fait de leur capacité à être stimulées *in vitro* par ces antigènes[1,2]. L'utilisation d'antigènes sélectionnés pour le complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti, M.canetti*) améliore la spécificité du test pour ces microorganismes en diminuant la réactivité croisée au BCG et à la plupart des mycobactéries environnementales[3,4]. Deux panels d'antigènes distincts, qui simulent les protéines ESAT-6 et CFP10 bien caractérisées, sont utilisés pour optimiser la sensibilité du test.

Le test T-SPOT.*TB* est une version simplifiée de la technique ELISPOT. Les tests ELISPOT sont d'une sensibilité exceptionnelle dans la mesure où la cytokine cible est capturée directement autour de la cellule sécrétrice, avant qu'elle ne soit diluée dans le surnageant, capturée par les récepteurs de cellules adjacentes ou encore dégradées. Ceci rend les tests ELISPOT beaucoup plus sensibles que les mesures ELISA conventionnelles[5]. Le test T-SPOT.*TB* est conçu pour détecter les cellules T effectrices qui répondent à une activation par des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*[3,4,6-9]. Ce test quantifie individuellement les cellules T activées par des antigènes spécifiques de la tuberculose. Il est adapté pour tous les patients à risque de LTBI ou suspectés de tuberculose[10,11], quel que soit leur âge, leur sexe, leur groupe ethnique, leur thérapie ou leur statut immunologique.

Principes de la procédure
Les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMC) sont séparées de l'échantillon de sang total et lavées pour éliminer toutes les sources de bruit de fond. Les PBMC sont ensuite comptées de sorte qu'un nombre standardisé de cellules soit utilisé. Ceci permet de garantir qu'un nombre adéquat de cellules est introduit dans les puits de microtitration et cela même chez ceux dont les titres de cellules T sont faibles en raison de l'affaiblissement de leur système immunitaire (individus immunocompromis ou immunosupprimés). Les étapes de lavage et de comptage ainsi que la technique d'ELISPOT permettent d'obtenir des résultats supérieurs dans la détection de la tuberculose ou d'infection tuberculeuse latente.

Quatre puits (voir Figure 1) sont nécessaires pour chaque prélèvement :-

1. Un Contrôle Négatif pour identifier l'activation cellulaire non-spécifique
2. Des antigènes spécifiques de la TB, Panel A (ESAT-6).
3. Des antigènes spécifiques de la TB, Panel B (CFP10).
4. Un Contrôle Positif à la phytohémagglutinine (PHA, un activateur polyclonal connu[12]) pour confirmer la fonctionnalité des PBMC.

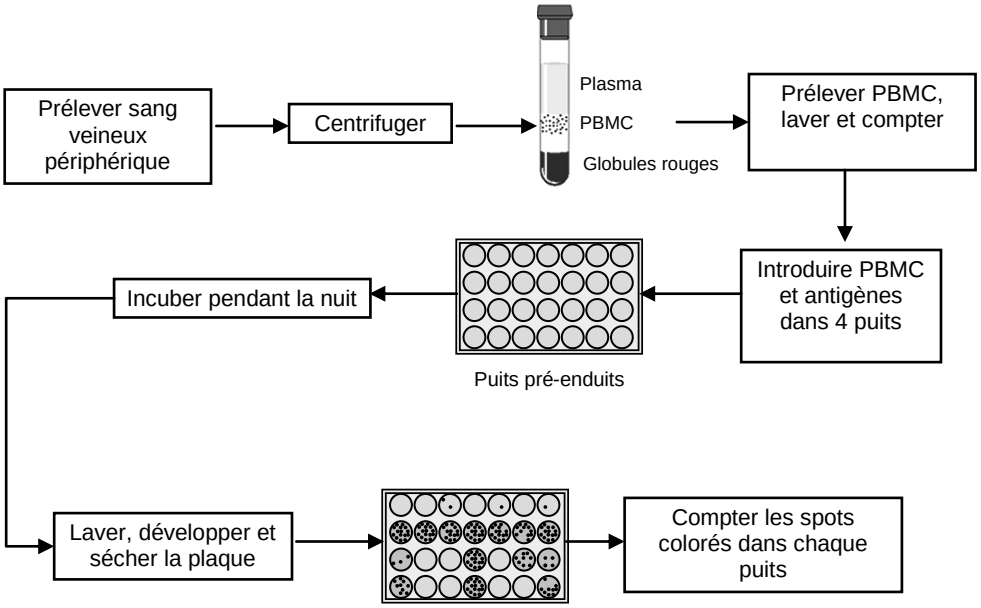


Figure 1 : Principales étapes du test T-SPOT.TB. Veuillez noter que chaque plaque contient 96 puits.

Les PBMC sont incubées avec les antigènes pour permettre la stimulation des cellules T sensibilisées éventuellement présentes. La cytokine produite est capturée par des anticorps spécifiques sur la membrane, qui forme la base du puits, et les cellules et autres matériels indésirables sont éliminés par lavage. Un second anticorps, conjugué à la phosphatase alcaline et dirigé sur un différent épitope de la cytokine, est ajouté et se fixe sur la cytokine capturée à la surface de la membrane. Tout conjugué non fixé est éliminé par lavage. Un substrat soluble est ajouté dans chaque puits ; il est clivé par l'enzyme qui lui est liée et forme ainsi un spot de précipité insoluble au site de la réaction. Chaque spot représente l'empreinte d'une cellule T individuelle sécrétrice de cytokines et le comptage des spots obtenus donne une mesure de la quantité de cellules T effectrices sensibles à *M. tuberculosis* dans le sang périphérique.

Limitations

- Pour diagnostic *in vitro* uniquement.
- Emploi professionnel uniquement.
- Le kit T-SPOT.*TB 96* est conçu pour un usage unique, alors que le kit T-SPOT.*TB 8* permet un usage multiple.
- Ne pas mélanger les composants de kits de lots différents
- Lire attentivement la notice d'utilisation avant l'emploi.
- Travailler de manière aseptique afin d'éviter de contaminer les réactifs, les puits, les suspensions cellulaires et les milieux de culture cellulaire.
- Tout écart par rapport aux techniques de pipetage et de lavage et aux temps et/ou températures d'incubation indiqués peut influencer les résultats obtenus et doit être évité.
- Le sang prélevé pour le test doit être utilisé dans les 8 heures. Ce délai peut être prolongé en utilisant le réactif T-Cell *Xtend*® (disponible auprès d'Oxford Immunotec). Lorsque le réactif T-Cell *Xtend* est utilisé conjointement au test T-SPOT.*TB*, le délai de conservation de l'échantillon est porté à 32 heures.
- Les prélèvements de sang doivent être conservés et transportés vers le laboratoire à température ambiante (18 à 25°C). Si le réactif T-Cell *Xtend* est utilisé, les échantillons peuvent être transportés et conservés à une température comprise entre 10 et 25°C. Ne pas réfrigérer ou congeler les échantillons de sang total.
- Le test T-SPOT.*TB* doit être utilisé et interprété uniquement dans le contexte du tableau clinique global.
- Un résultat négatif du test n'exclut pas la possibilité d'une exposition à ou d'une infection par *M. tuberculosis.*

- Les antigènes ESAT-6 et CFP10 sont absents dans les souches BCG et dans la plupart des mycobactéries environnementales, excepté *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*[3,4] et *M. gordonae*.

Mises en garde sécuritaires et précautions
Des précautions doivent être prises lors de la manipulation de produits d'origine humaine. Tous les échantillons de sang doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

La manipulation des échantillons de sang et des composants de l'essai ainsi que leur utilisation, conservation et élimination doivent se faire conformément aux procédures stipulées dans les directives ou règlements nationaux appropriés sur la protection contre les biorisques.

Des précautions doivent être prises lors du travail avec des produits chimiques. Tous les produits chimiques doivent être considérés comme potentiellement dangereux.

Matériel fourni

Le kit T-SPOT.*TB 8* contient :

1. 1 plaque de microtitration : 96 puits, fournis sous forme de 12 bandes de 8 puits dans un cadre, enduits d'un anticorps monoclonal murin anti-cytokine interféron gamma (IFN-γ).
2. 2 flacons (0,8 ml chacun) – Panel A : contenant antigènes ESAT-6, albumine bovine et agents antimicrobiens.
3. 2 flacons (0,8 ml chacun) – Panel B : contenant antigènes CFP10, albumine bovine et agents antimicrobiens.
4. 2 flacons (0,8 ml chacun) – Contrôle Positif : contenant la phytohémagglutinine (PHA), utilisée comme contrôle de la fonctionnalité des cellules, albumine bovine et agents antimicrobiens.
5. 1 flacon (50 µl) de réactif conjugué concentré 200 x : anticorps monoclonal murin anti-cytokine IFN-γ conjugué à la phosphatase alcaline.
6. 1 flacon (25 ml) de solution de substrat : solution BCIP/NBT^{plus} prête à l'emploi.
7. Mode d'emploi que l'on retrouve sur le CD avec la fiche signalétique des données de sécurité, le Guide de formation, le calculateur de dilution cellulaire T-SPOT, le calculateur de dilution du réactif conjugué, le calculateur de vitesse de centrifugation et le programme T-SPOT.*AutoReporter*.

Conservation
Conserver tous les composants du kit à une température située entre 2 et 8°C.
Eviter l'exposition prolongée de la solution de substrat à la lumière.
Stabilité
Ne pas mélanger les composants de kits de lots différents. Conserver le kit non ouvert à une température de 2 à 8°C. Les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage du kit, s'ils sont conservés et manipulés dans les conditions recommandées. Le kit ne doit pas être utilisé après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Conserver les composants ouverts du kit à une température de 2 à 8°C. Les composants ouverts doivent être utilisés dans les 8 semaines après ouverture

Equipement et matériel nécessaires mais non fournis
1. Cadre pour plaque à bandes de 8 puits (disponible chez Oxford Immunotec) pour une utilisation avec un kit T-SPOT.*TB 8*.
2. Hotte microbiologique de classe II (recommandé).
3. Tubes de prélèvement sanguin tels que Vacutainer® CPT™ (disponibles auprès d'Oxford Immunotec) ou tubes héparinés.
4. FICOLL-PAQUE* PLUS ou autre milieu de séparation des PBMC.

5. Réactif T-Cell *Xtend* (disponible auprès d'Oxford Immunotec) pouvant être utilisé avec les échantillons recueillis plus de 8 heures auparavant.
6. Tubes Leucosep pouvant être utilisés pour simplifier la séparation des PBMC avec la méthode FICOLL*.
7. Centrifugeuse pour la préparation des PBMC (capable d'au moins 1800 x g et de maintenir les échantillons à température ambiante (18 à 25°C)).
8. Equipement et réactifs permettant de compter les PBMC ; soit manuellement avec du bleu trypan et un hémocytomètre au microscope soit automatiquement à l'aide d'un analyseur hématologique.
9. Incubateur humidifié à 5 % de CO_2 - 37 ± 1°C.
10. Laveur de plaques de microtitration ou matériel pour le lavage manuel des plaques.
11. Pipettes et embouts de pipette stériles.
12. D-PBS stérile tel que GIBCO® 1 x D-PBS (Invitrogen ; numéro de catalogue 14040-091).
13. Eau distillée ou eau déionisée.
14. Un moyen de lecture des plaques tel qu'un microscope, un microscope numérique, une loupe ou un lecteur de plaque.
15. Milieu de culture cellulaire stérile tel que GIBCO AIM V® (Invitrogen ; numéro de catalogue 31035-025) : l'utilisation de ce milieu sans sérum dans l'étape d'incubation est fortement recommandée. Le milieu RPMI 1640 (Invitrogen ; numéro de catalogue 21875-034) ne peut être utilisé que pour les étapes initiales de préparation des échantillons. Il est recommandé de conserver le milieu de culture cellulaire dans des aliquotes appropriées et d'éliminer le matériel excédentaire après emploi. Le milieu de culture cellulaire doit être réchauffé à 37°C avant de l'utiliser avec le test T-SPOT.*TB.*

Préparation du réactif

1. Plaque de microtitration. La plaque de microtitration T-SPOT.*TB 8* est fournie prête à l'emploi. Sortir le nombre requis de bandes de 8 puits du lieu de conservation et laisser se stabiliser à température ambiante. Refermer hermétiquement les bandes restantes dans l'emballage extérieur en aluminium avec le sachet de déshydratant.
2. Les flacons d'antigènes ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Panel A) sont fournis prêts à l'emploi.
3. Les flacons d'antigènes CFP10 de *M. tuberculosis* (Panel B) sont fournis prêts à l'emploi.
4. Les flacons de Contrôle Positif sont fournis prêts à l'emploi.
5. Préparer une solution de travail de conjugué dilué à 1:200. Calculer le volume de la solution de travail de conjugué nécessaire (voir le calculateur de dilution du conjugué T-SPOT sur le CD fourni avec chaque kit) et la préparer juste avant l'emploi.
6. La solution de substrat est fournie prête à l'emploi. La sortir de son lieu de conservation et la laisser se stabiliser à température ambiante.

Méthode

Cet essai doit être réalisé selon les principes des Bonnes Pratiques de Laboratoire et en adhérant rigoureusement à ce mode d'emploi.

Oxford Immunotec Ltd a préparé un Guide de formation qui décrit le prélèvement et la préparation des échantillons, le choix du milieu de culture des cellules et les méthodes de comptage des spots. Ce document est disponible sur le CD fourni avec chaque kit, peut être obtenu en appelant le +44 (0) 1235 442780 ou téléchargé à partir de www.oxfordimmunotec.com.

Prélèvement et préparation des échantillons

Les utilisateurs doivent valider leurs propres procédures de recueil des PBMC, d'énumération des PBMC et de choix du milieu adapté pour supporter la fonctionnalité des cellules T au cours de l'étape d'incubation primaire du test. Normalement, chez un sujet immunocompétent, il est possible d'obtenir suffisamment de PBMC provenant de prélèvements de sang veineux pour réaliser l'essai selon les directives suivantes :

- Adultes et enfants de plus de 10 ans : un tube CPT de 8 ml, deux tubes CPT de 4 ml, ou un tube héparine de 6 ml
- Enfants de 2 à 9 ans : un tube CPT ou héparine de 4 ml
- Enfants de moins de 2 ans : un tube pédiatrique de 2 ml

Les échantillons de sang doivent être conservés à température ambiante et testés dans les 8 heures suivant le prélèvement ou après 32 heures et conservés à 10-25°C si l'échantillon est traité par le réactif T-Cell *Xtend*.

Le milieu de culture cellulaire doit être réchauffé à 37°C avant de l'utiliser avec le test T-SPOT.*TB.*

Méthode	**Notes**
1. Prélever un échantillon de sang selon le mode d'emploi fourni avec le dispositif de prélèvement. Conserver le sang prélevé à température ambiante (18 à 25°C) ou entre 10 et 25°C si le réactif T-Cell *Xtend* est utilisé. Ne pas réfrigérer ni congeler.	1. Les échantillons de sang peuvent être recueillis dans divers tubes. Dans nos laboratoires, nous avons utilisé avec succès des tubes Vacutainer CPT citrate, des tubes CPT héparine et des tubes héparine standards. Seuls les tubes héparine peuvent être utilisés avec le réactif T-Cell *Xtend*. Les tubes EDTA ne sont pas recommandés.

2. Avec les tubes CPT de prélèvement de sang, suivre les consignes du fabricant pour la séparation des PBMC. Avec les autres méthodes de prélèvement de sang, séparer les PBMC par centrifugation sur FICOLL-PAQUE PLUS en utilisant les procédures publiées.	2. Centrifuger un tube CPT de 8 ml à 1600 x g pendant 28 min ou un tube CPT de 4 ml à 1800 x g pendant 30 min à une température de 18°C si une centrifugation réfrigérée est possible. Laisser la centrifugeuse atteindre 18°C si une température inférieure a été utilisée. Si une centrifugeuse non réfrigérée est utilisée, s'assurer que la température ne dépasse pas les 25°C. Ou bien, diluer le sang avec un volume égal de milieu RPMI 1640. Déposer soigneusement le sang dilué (2-3 volumes) sur le FICOLL-PAQUE PLUS (1 volume) et centrifuger à 1000 x g pendant 22 min tout en maintenant la température entre 18 et 25°C. Le calculateur de vitesse de centrifugation disponible sur le CD fourni avec le kit peut aider à convertir les vitesses de xg en rpm. Si les échantillons ont été prélevés entre 8 et 32 heures plus tôt, ils devraient être mélangés au réactif T-Cell *Xtend* avant d'être déposés sur FICOLL-PAQUE PLUS. La procédure est décrite de façon détaillée dans la notice fournie avec le réactif T-Cell *Xtend*. Si des tubes Leucosep ou le réactif T-Cell *Xtend* (disponibles auprès d'Oxford Immunotec) sont utilisés, suivre les protocoles fournis avec ces produits.
3. Recueillir la bande blanche et trouble de PBMC à l'aide d'une pipette et transférer dans un tube à centrifuger conique de 15 ml. Ajouter le milieu de culture cellulaire pour obtenir un volume de 10 ml.	3. Divers milieux peuvent être utilisés pour laver les cellules durant ce processus. Dans nos laboratoires, les milieux AIM V et RPMI 1640 ont tous deux été utilisés avec succès et sont recommandés.
4. Centrifuger à 600 x g pendant 7 min. Vider le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de milieu.	4. Voir 3, ci-dessus.
5. Ajouter du milieu neuf pour obtenir un volume de 10 ml et centrifuger à 350 x g pendant 7 min.	5. Voir 3, ci-dessus.
6. Vider le surnageant et resuspendre le culot dans 0,7 ml de milieu de culture AIM V.	6. A ce stade, le culot doit être resuspendu dans le milieu de culture pour l'incubation de nuit. Dans nos laboratoires, le milieu sans sérum AIM V a été utilisé avec succès et est fortement recommandé.

Les cellules T obtenues à partir d'autres liquides organiques, tel qu'un lavage broncho-alvéolaire (LBA), un épanchement pleural (EP) ou un liquide cérébrospinal (LCS), ont été utilisées avec succès avec le test T-SPOT.*TB* afin d'identifier une tuberculose ou une infection TB. (Jafari *et al* (2006) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **174** 1048-1054, Jafari *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 261-265, Strassburg *et al* (2008) Eur. Resp. J. **31** 1132-1135, Jafari *et al* (2009) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **180**(7) 666-673, Dheda *et al* (2009) Thorax **64**(10) 847-853 et Patel *et al* (2010) Am. J. Respir. Crit. Care Med. **182**(4) 569-77). En cas d'utilisation d'échantillons non sanguins, les utilisateurs doivent valider les procédures pour le prélèvement d'une quantité suffisante de cellules mononuclées. Les méthodes pour le traitement des échantillons de LBA sont décrites dans les publications mentionnées ci-dessus.

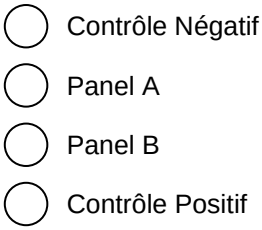
Remarque 1 : la valeur-seuil pour un résultat positif et des contrôles valides pour le test, au moyen d'échantillons non sanguins, n'ont pas fait l'objet d'une évaluation approfondie et peuvent différer du test sanguin. Les utilisateurs devront définir leurs propres critères d'interprétation du test. Les cliniciens devront faire appel à leur jugement lors de l'examen des résultats.

Remarque 2 : le délai entre l'obtention de l'échantillon et le début du test n'a pas été étudié de manière approfondie.

Comptage des cellules et dilution
Le test T-SPOT.*TB* nécessite 2,5 x 10^5 PBMC viables par puits. Au total quatre puits sont requis pour chaque échantillon d'un patient. Le nombre de cellules introduites dans chaque puits doit être correct, faute de quoi l'interprétation du résultat risque d'être erronée.

Méthode	**Notes**
1. Effectuer le comptage des cellules viables.	1. Les cellules peuvent être comptées de plusieurs façons dont le comptage manuel en utilisant du bleu trypan et un hémocytomètre et le comptage automatique à l'aide d'un instrument approprié.
2. En bref, pour le comptage manuel au moyen d'un hémocytomètre Neubauer, introduire 10 µl de suspension cellulaire finale dans 40 µl de solution de bleu trypan à 0,4 % (p/v). Placer un volume approprié sur l'hémocytomètre et compter les cellules dans la grille. Pour les autres types d'hémocytomètre et pour les instruments automatiques, suivre les consignes du fabricant.	2. Faire attention et s'assurer que la suspension de cellules est entièrement mélangée juste avant le prélèvement en vue de la dilution ou du comptage car des cellules peuvent se déposer au fond du tube ce qui entraînerait une interprétation erronée du vrai nombre de cellules.
3. Calculer la concentration de cellules viables présentes dans la suspension de cellules mère.	3. S'assurer que le calcul est correct compte tenu du système de comptage utilisé, l'utilisation d'un nombre de cellules insuffisant ou excessif pouvant entraîner une interprétation erronée du résultat. Le calculateur de dilution cellulaire T-SPOT disponible sur le CD fourni avec chaque kit facilitera ce calcul.
4. Préparer 500 µl de suspension de cellules finale à une concentration de 2,5 x 10^5 cellules/ 100 µl.	4. S'assurer que les cellules sont bien mélangées avant le prélèvement en vue de la dilution.

Préparation de la plaque et incubation
Le test T-SPOT.*TB* nécessite quatre puits pour chaque échantillon d'un patient. Un Contrôle Négatif et un Contrôle Positif de la fonctionnalité des cellules doivent être effectués sur chaque échantillon individuel. Il est recommandé d'organiser les échantillons verticalement sur la plaque, comme illustré ci-dessous.



Méthode	Notes
1. Dans le cas du test T-SPOT.*TB 8*, sortir les bandes de 8 puits pré-enduites de l'emballage, clipper sur un cadre pour plaque et laisser stabiliser à température ambiante	1. Ne sortir que le nombre de bandes requis et remettre le reste dans le lieu de conservation. Clipper les bandes qui seront utilisées sur un cadre pour plaque vide muni d'une protection et d'un couvercle. Les cadres, protections et couvercles sont réutilisables et doivent être conservés.
2. Quatre puits sont nécessaires pour chaque échantillon d'un patient ; (i) Introduire 50 µl de milieu de culture AIM V dans chaque puits de Contrôle Négatif. (ii) Introduire 50 µl de solution du Panel A dans chaque puits nécessaire. (iii) Introduire 50 µl de solution du Panel B dans chaque puits nécessaire. (iv) Introduire 50 µl de solution de Contrôle Positif dans chaque puits de contrôle de la fonctionnalité des cellules.	2. Ne pas toucher la membrane avec l'embout de la pipette. Les indentations dans la membrane causées par l'embout des pipettes peuvent causer des artefacts dans les puits. Il sera peut-être nécessaire de tapoter la plaque pour s'assurer que les solutions couvrent la membrane au fond de chaque puits. Eviter de l'agiter vigoureusement pour minimiser la possibilité de contamination croisée des antigènes entre les puits.
3. Dans chacun des 4 puits qui sera utilisé pour l'échantillon d'un patient, introduire 100 µl de suspension de cellules finale du patient (contenant 250 000 cellules viables).	3. Mélanger la suspension de cellules en pipetant soigneusement plusieurs fois avant de prélever chaque aliquote de 100 µl. Il est recommandé d'utiliser un nouvel embout pour chaque prélèvement de cellules T de chaque patient pour éviter la possibilité de contamination entre les 4 puits.
4. Incuber la plaque à 37°C dans un incubateur humidifié à 5 % de CO_2 pendant 16 à 20 heures.).	4. Eviter de remuer la plaque une fois qu'elle se trouve dans l'incubateur. Ne pas empiler les plaques car cela peut entraîner une répartition inégale de la température et de la ventilation. Le non respect des conditions et du temps d'incubation recommandés peut entraîner une interprétation erronée du résultat. Vérifier que l'incubateur contienne suffisamment d'eau pour maintenir l'humidité pendant la période d'incubation.

Développement et comptage des spots

Pendant les étapes de lavage de la plaque et de développement, ne pas toucher la membrane avec l'embout des pipettes ou les canaux du laveur de puits automatisé. Les indentations de la membrane causées par l'embout des pipettes ou du laveur de puits peuvent se révéler comme des artefacts dans les puits, ce qui pourrait perturber le comptage des spots..

Méthode	Notes
1. Sortir la plaque de l'incubateur et éliminer le milieu de culture des cellules.	1. A ce moment-là, sortir la solution de substrat du kit et laisser se stabiliser à température ambiante.
2. Introduire 200 µl de solution D-PBS dans chaque puits.	
3. Eliminer la solution D-PBS. Répéter le lavage du puits encore 3 fois avec de la solution fraîche pour chaque lavage.	3. Eliminer tout le D-PBS de la dernière étape de lavage en retournant la plaque sur du papier absorbant avant de continuer.
4. Diluer le réactif conjugué concentré au 1/200ème avec le D-PBS pour obtenir la solution de travail.	4. Ne pas utiliser de D-PBS contenant du Tween® ou d'autres détergents car cela entraîne un bruit de fond élevé. S'assurer de ne préparer qu'une petite quantité excédentaire

	de la solution de travail (pour permettre une perte). Ainsi, avec le test T-SPOT.*TB 96*, pour lequel chacun des 96 puits nécessite 50 µl, préparer 5 ml de la solution de travail en ajoutant 25 µl de réactif conjugué concentré à 4975 µl de D-PBS. Pour le test T-SPOT.*TB 8* et pour chaque bande de 8 puits (chaque puits nécessitant 50 µl), préparer 500 µl de la solution de travail en ajoutant 2,5 µl de réactif conjugué concentré à 497,5 µl de D-PBS. Le calculateur de dilution du conjugué disponible sur le CD fourni avec chaque kit de test peut être utilisé pour effectuer ce calcul.
5. Introduire 50 µl de solution de travail du réactif conjugué dans chaque puits et incuber à 2 à 8°C pendant 1 heure.	5. Le non respect du temps d'incubation recommandé peut entraîner une interprétation erronée du résultat.
6. Eliminer le conjugué et effectuer quatre lavages au D-PBS comme décrit aux étapes 2 et 3 ci-dessus.	
7. Introduire 50 µl de solution de substrat dans chaque puits et incuber à température ambiante pendant 7 min.	7. Le non respect du temps d'incubation recommandé peut entraîner une interprétation erronée du résultat.
8. Laver la plaque abondamment avec de l'eau distillée ou déionisée pour arrêter la réaction de détection.	
9. Laisser sécher la plaque en la mettant dans un endroit bien aéré ou dans un four à une température maximale de 37°C.	9. Les spots deviennent plus visibles avec le séchage de la plaque. Laisser sécher 4 heures à 37°C ou jusqu'au lendemain à température ambiante.
10. Compter et noter le nombre de spots bleu foncé distincts sur la membrane de chaque puits. Appliquer l'Interprétation des résultats et Critères du test (voir ci-dessous) pour déterminer si l'échantillon du patient est « Positif » ou « Négatif » aux antigènes TB.	10. Les spots peuvent être visualisés de plusieurs façons à savoir une loupe à main, un microscope adéquat, un microscope numérique ou un lecteur de plaque ELISPOT dédié. Un guide de formation au comptage des spots (le programme T-SPOT.*Tutor*) peut être obtenu sur le site internet d'Oxford Immunotec.

Contrôle de la qualité

Dans un résultat type, on s'attend à ce qu'il y ait peu ou pas de spots dans le Contrôle Négatif et plus de 20 spots dans le Contrôle Positif.

Le Contrôle Négatif sera considéré comme « Indéterminé » si le nombre de spots comptés est supérieur à 10. Se référer au Guide de formation T-SPOT.*TB* pour les causes possibles (télécharger à partir de www.oxfordimmunotec.com). Il est recommandé de prélever un autre échantillon sur l'individu et de refaire le test.

Normalement, le nombre de spots pour le Contrôle Positif de la fonctionnalité des cellules devrait être ≥ 20 ou montrer une saturation (spots trop nombreux pour les compter). Il est possible que les cellules T d'une faible proportion de patients ne montre qu'une réaction limitée à la PHA[13,14]. Le Contrôle Positif sera considéré comme « Indéterminé » quand le nombre de spot est < 20 spots, à moins que le Panel A ou le Panel B ne soit « Positif » tel que décrit dans l'Interprétation des résultats et Critères du test (voir ci-dessous), auquel cas, le résultat est valide.

En raison des variations biologiques et systématiques potentielles, lorsque le nombre de spots (spots au Panel A moins spots au Contrôle négatif) et (spots au Panel B moins spots au Contrôle

négatif) le plus élevé est de 5, 6 ou 7, le résultat peut être considéré comme « limite » (équivoque). Les résultats limites (équivoques), bien que valides, sont moins fiables que les résultats plus éloignés de la valeur seuil. Il est donc recommandé de retester le sujet concerné à l'aide d'un nouveau prélèvement. Si le résultat est toujours limite (équivoque) après ce nouveau test, il convient d'utiliser d'autres tests diagnostiques et/ou d'autres informations épidémiologiques pour aider à déterminer le statut infectieux du patient.

Bien que les antigènes ESAT-6 et CFP10 soient absents dans les souches BCG de *M. bovis* et dans la majorité des mycobactéries environnementales, il est possible qu'un résultat « Positif » au test T-SPOT.*TB* soit dû à une infection par *M. kansasii*, *M. szulgai, M. marinum* ou *M. gordonae.* D'autres tests sont requis si ces infections sont suspectées.

Interprétation des résultats et critères du test
Veuillez vous référer à la section Contrôle de la Qualité avant d'appliquer les critères suivants.

Le test T-SPOT.*TB* s'interprète en soustrayant le nombre de spots du Contrôle Négatif du nombre de spot dans chacun des panels, selon l'algorithme suivant :

- Le résultat du test est « Positif » si (Panel A moins Contrôle Négatif) et/ou (Panel B moins Contrôle Négatif) est ≥ 6 spots
- Le résultat du test est « Négatif » si (Panel A moins Contrôle Négatif) et (Panel B moins Contrôle Négatif) sont ≤ 5 spots. Ceci comporte les valeurs inférieures à zéro.

Un résultat « Positif » indique que l'échantillon contient des cellules T effectrices réagissant à *M. tuberculosis.*

Un résultat « Négatif » indique que l'échantillon ne contient probablement pas de cellules T effectrices réagissant à *M. tuberculosis*.

Caractéristiques de performance du test

La **spécificité** a été évaluée en testant 93 échantillons de donneurs qui, d'après leurs antécédents médicaux et les renseignements personnels, ont été jugés comme présentant un faible risque d'infection par *M. tuberculosis*. La spécificité du test T-SPOT.*TB* a été calculée comme étant de 100 % (93/93) (niveau de confiance 95 % avec intervalles de confiance de 95,8 % à 100 %).

La **sensibilité** a été évaluée en testant 87 échantillons provenant de cas d'infection par *M. tuberculosis* confirmés par culture, comprenant des groupes immunodéprimés. La sensibilité du test T-SPOT.*TB* a été calculée à 98,8 % (86/87) (niveau de confiance 95 % avec intervalles de confiance de 90,8 % à 99,9 %).

La **reproductibilité** a été évaluée, comme marqueur de substitution de la variation intra essai, par une analyse des échantillons sanguins effectuée en duplicat sur la même plaque. Au total, 145 échantillons sanguins provenant de 140 donneurs différents ont été testés en duplicat (deux puits pour le Panel A et deux puits pour le Panel B) en utilisant le test T-SPOT.*TB*. Une concordance clinique a été observée dans 142/145 (97,9 %) analyses des duplicats. Deux duplicats ont donné des résultats marginalement discordants et 1/145 échantillons a donné des résultats en désaccord.

Références

1. Janeway and Travers (1996) *Immunobiology* 2nd Ed.
2. Staines *et al* (1999) *Introducing Immunology* 2nd Ed.
3. Chapman *et al* (2002) AIDS, **16** (17): 2285-2293.
4. Ewer *et al* (2003) Lancet, **361**: 1168-1173.
5. Voir www.elispot-analyzers.de/english/science-elispot-assays.html
6. Pathan *et al* (2001) J. Immunol., **167**: 5217-5225.
7. Lalvani *et al* (2001) Lancet, **357**: 2017-2021.
8. Lalvani *et al* (2001) Am. J. Resp. Crit. Care Med., **163**: 824-828.
9. Lalvani *et al* (2001) J. Infect. Dis., **183**: 469-477.
10. Meier *et al* (2005) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **24**: 529-536.
11. Zellweger *et al* (2005) Int. J. Tuberculosis and Lung Dis., **9**(11): 1242-1247.
12. Directive approuvée par le NCCLS. *Performance of single Cell Immune Response Assays*, I/LA26-A
13. Koller *et al* (2003) Clin. Exp. Immunol., **132**(2): 225-231.
14. Apollonj *et al* (1975) Immunol. Commum., **4**(5): 453-463.

Glossaire des symboles

	A utiliser avant/Date de péremption (An-Mois-Jour)
LOT	Numéro de lot
REF	Numéro de catalogue
⚠	Attention, voir le mode d'emploi
	Fabricant
▽	Suffisant pour "n" tests
IVD	Dispositif de diagnostic *in vitro*
	Limite de température/A conserver entre
	Se référer au mode d'emploi avant de procéder

T-SPOT, T-Cell *Xtend* et le logo d'Oxford Immunotec sont des marques de commerce d'Oxford Immunotec Limited.
AIM V et GIBCO sont des marques de commerce d'Invitrogen.
CPT et Vacutainer sont des marques de commerce de Becton Dickinson.
* FICOLL et FICOLL-PAQUE sont des marques de commerce des sociétés du groupe GE.
Tween est une marque de commerce d'Uniqema Americas LLC.

Le test T-SPOT.*TB* est protégé par les brevets et les brevets en instance suivants :
US 7575870, US12/510,594, EP 941478, JP 4094674, AU 728357, CA 2272881, US 7115361, US 7632646, EP 1144447, JP 4633931, ZA 2001-3356, US7901898, US8216795; US13/489,621; US6290969, US6338852, US11/801,112, EP 1203817, JP 2006-034593, AU 727602, , CA2653566, , CN1200147, CZ300953, HU0900047, NO 9800883, TR2009/01109, ZA 9607394, ZW 10496; US 5955077, EP 0706571, , AU 682879, CA 2165949, NZ 267984, US 7579141, US8021832, EP 1214088, JP4820489, AU 773268, CA 2372583.

L'utilisation du réactif T-Cell *Xtend* est protégée par les brevets et brevets en instance suivants :
EP2084508; US13/253,598, CN101529221, AU2007-303994, JP2009-530943, IN2165/DELNP/2009, CA2665205.

Le test T-SPOT.*TB* intègre une technologie brevetée accordée sous licence par le Statens Serum Institut, Copenhague, Danemark et Isis Innovation Limited, Oxford, RU.

© Oxford Immunotec Limited, 2013. Tous droits réservés.

Fabricant
Oxford Immunotec Ltd
94C Innovation Drive, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4RZ, RU
www.oxfordimmunotec.com